

## TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

---

# Caracterización clonal del linaje NG2

**Autor/a:** María Sonsoles Barriola Ortiz de Zárate

**Co-directoras:** Laura López Mascaraque y Ana Bribián Arruego

**Afiliación:** Instituto Cajal (CSIC), Departamento de Neurobiología Molecular, Celular y del Desarrollo

*Avenida Doctor Arce, 37 28002, Madrid*

Laura López Mascaraque y Ana Bribián Arruego

Instituto Cajal – CSIC

Avda. Dr Arce 37

28002 – Madrid


Como Directoras del Trabajo de Fin de Máster titulado “Caracterización clonal del linaje NG2”, realizado por María Sonsoles Barriola Ortiz de Zárate como parte de sus trabajos para la obtención del Título de Máster en Neurociencia por la Universidad Autónoma de Madrid,

DECLARAMOS:

Que reúne los méritos suficientes para poder ser presentado y definido públicamente

Que el uso de animales utilizados en este TFM, está amparado por la autorización del Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y por la Comunidad de Madrid (PROEX 223/16).

Madrid, 15 de marzo de 2019



Fdo.: Laura López Mascaraque



Fdo.: Ana Bribián Arruego

## Índice

<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
<i>El desarrollo del sistema nervioso central .....</i>	<i>3</i>
<i>Las células de la glía NG2.....</i>	<i>5</i>
<i>Heterogeneidad en las células de la glía NG2 .....</i>	<i>7</i>
<i>Rastreo de linajes celulares.....</i>	<i>9</i>
<b>Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>15</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>17</b>
<i>Animales.....</i>	<i>17</i>
<i>Electroporación Intra Utero (IUE) .....</i>	<i>17</i>
<i>Procesamiento del tejido .....</i>	<i>17</i>
<i>Caracterización inmunohistoquímica .....</i>	<i>18</i>
<i>Vectores de ADN .....</i>	<i>18</i>
<i>Adquisición de imágenes.....</i>	<i>19</i>
<i>Análisis de datos .....</i>	<i>19</i>
<b>Resultados .....</b>	<b>21</b>
<i>Caracterización de los linajes identificados con NG2-StarTrack.....</i>	<i>21</i>
<i>Análisis clonal de los linajes que expresan NG2 .....</i>	<i>22</i>
<i>Distribución cortical del linaje oligodendroglial en sustancia blanca y sustancia gris</i>	<i>25</i>
<i>Dispersión clonal de las células de distintos linajes en el eje rostro-caudal .....</i>	<i>25</i>
<b>Discusión.....</b>	<b>28</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>30</b>

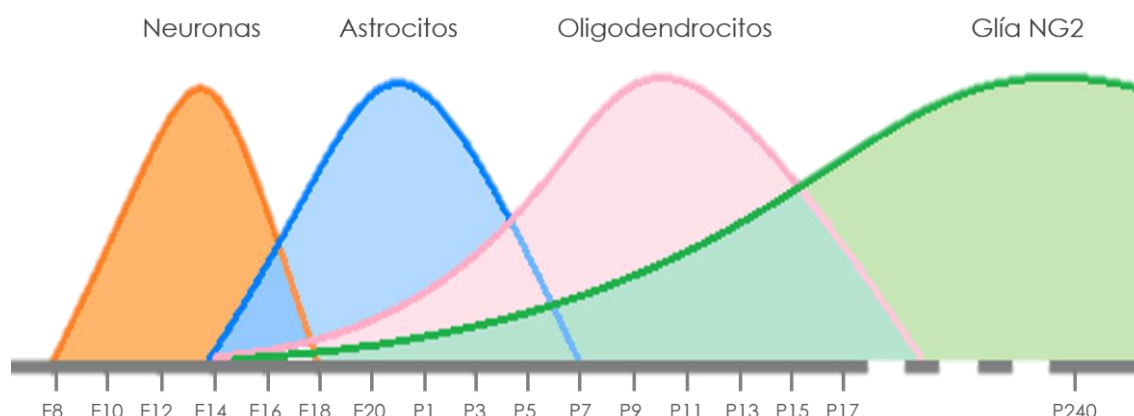
## Introducción

### *El desarrollo del sistema nervioso central*

El desarrollo del sistema nervioso central (SNC) es un proceso por el cual las células progenitoras neurales – caracterizadas por su capacidad auto-regenerativa y multipotente – van encadenando procesos de proliferación y diferenciación para dar lugar a los distintos linajes neurales presentes en el cerebro adulto (Götz Y Huttner, 2005): neuronas y células de la glía, que incluyen distintos tipos celulares englobados en dos categorías: microglía y macroglía, en base a su tamaño celular. La microglía, descrita por primera vez, hace 100 años, por Pío del Río-Hortega (del Río-Hortega, 1919) comprende entre un 5% y un 20% de la población glial del SNC, deriva del mesodermo (Ginhoux y Prinz, 2015) y tiene un papel importante en la respuesta inmune (ver Kettenmann y cols., 2011). La macroglía, deriva del neuroectodermo, e incluye las células de mayor tamaño: la astrogliá, que incluye astrocitos, glía radial y glía endimaria (Reichenbach y Wolburg, 2005), la oligodendroglía, que incluye distintos tipos de oligodendrocitos (Butt y cols., 2005) y las células de la glía NG2 (Richardson y cols., 2011), que durante el desarrollo embrionario y en el cerebro adulto normal y patológico dan lugar a oligodendrocitos. Del Río-Hortega los describió por primera vez como “células interfasciculares” (del Río-Hortega 1919), y más tarde les acuñó el nombre de oligodendrocitos (del Río-Hortega, 1921; Sierra y cols., 2016).

Las células progenitoras neurales forman el epitelio pseudoestratificado (de origen ectodérmico), que durante estadios tempranos del desarrollo rodea los ventrículos del tubo neural, por lo que también se las conoce como células neuroepiteliales (Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009). Las células progenitoras neurales dan lugar tanto a neuronas como a los distintos tipos de células gliales en distintas ventanas temporales, que solapan unas con otras (Figura 1). Durante el desarrollo cortical en roedores, primero comienza el proceso de neurogénesis, alrededor de los días 9 y 10 embrionarios (E9-10), seguido por la gliogénesis – primero astrogliogénesis y después oligodendrogénesis – que empieza alrededor de E14 y termina en etapas postnatales (Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009; Martynoga y cols., 2012). Las células de la glía NG2, tienen distintas olas de generación temporales y regionales a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal (Hill y Nishiyama, 2014; Dimou y Gallo, 2015), lo que lleva a pensar en la existencia de diversidad entre los distintos grupos de células de un mismo linaje glial NG2 (García-Marqués y cols., 2014). Esta heterogeneidad – tema altamente debatido en la actualidad (Dimou y cols., 2008; Rivers y cols., 2008; Zhu y cols., 2011; Dimou y Gallo, 2015) – explicaría la gran diversidad de funciones descritas para este linaje celular: células precursoras de oligodendrocitos durante el desarrollo y en edades adultas, células multipotentes con capacidad para diferenciarse a astrocitos y neuronas (actualmente hay controversias al respecto) (Richardson y cols., 2011; Clarke y cols., 2012), su capacidad de movilización y reparación en procesos de desmielinización reponiendo la ausencia de oligodendrocitos mielinizantes (Zawadzka y cols., 2010), y por último su

papel en el establecimiento de contactos sinápticos tanto en el hipocampo como en el cerebelo (Bergles y cols., 2000).

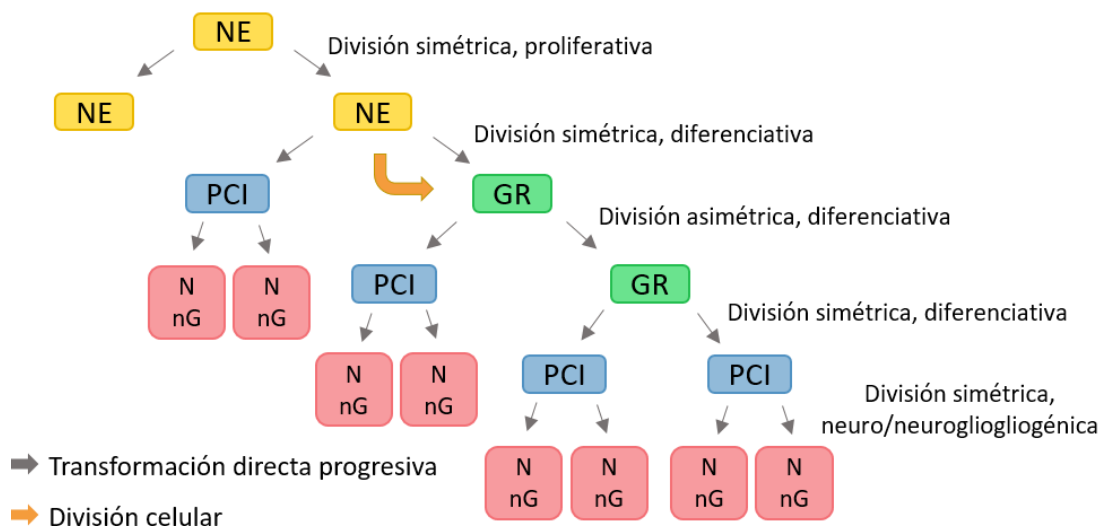


**Figura 1: Secuencia temporal del desarrollo de los linajes neuronal y gliales.** La especificación de los distintos linajes neurales tiene lugar a lo largo de distintas oleadas temporales solapantes entre sí. En roedores, el pico de la neurogénesis se da el día 14 embrionario. La generación de astrocitos y oligodendrocitos tiene lugar en estadios embrionarios y postnatales, mientras que la generación de células de la glía NG2 se inicia en estadios embrionarios, y continúa hasta la edad adulta. La generación de interneuronas comienza en el embrión y continúa postnatalmente en el bulbo olfatorio y el giro dentado (modificado de Wang y Bordey, 2008).

Las células neuroepiteliales sufren una transformación temprana en E9 (Edwards y cols., 1990; Chanas-Sacre y cols., 2000) por la que comienzan a adquirir características asociadas a células de la glía. Como, por ejemplo, el paso de complejos de unión estrechos a uniones adherentes y a los contactos típicos de los astrocitos con las células endoteliales de la vasculatura del cerebro en desarrollo (Kriegstein y Alvarez – Buylla, 2009). Asimismo, expresan algunos marcadores astrogliales; el transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST), la proteína de unión a lípidos del cerebro (BLBP) y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Martynoga y cols., 2012). Así, comienza una transición progresiva de células epiteliales a células de la glía radial en la zona ventricular (ZV) (Wang y Bordey, 2008). Las células de la glía radial conservan la polaridad apical-basal de las células neuroepiteliales, unidas mediante un proceso basal y otro apical, a las superficies pial y ventricular respectivamente (Ganat y cols., 2006; Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009). Las células neuroepiteliales pueden dividirse de forma simétrica (proliferativa), o de manera asimétrica (neurogénica). Esta última es también propia de la glía radial, que además puede dividirse de forma simétrica dando lugar a dos progenitores intermedios (Götz y Huttner, 2005) (Figura 2).

Las células de la glía radial, mediante esas divisiones celulares asimétricas, son capaces de auto-renovarse y de generar varios tipos de células hijas, dependiendo del momento del desarrollo. Por un lado, dan origen a neuronas y a células de la neuroglia y por otro, a células progenitoras basales o intermedias de neuronas (CPIn) y de células de la glía –

astrocitos (CPIa) y oligodendrocitos (CPIo) – que pueblan la zona subventricular (ZSV) embrionaria y postnatal respectivamente, y que migran al córtex donde se diferencian a su destino neural (Wang y Bordey, 2008; Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009, Martynoga y cols., 2012). Estos progenitores intermedios tienen un potencial de diferenciación más restringido y son precursores de un solo linaje neural (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009), mediante divisiones simétricas se diferencian en dos células del tipo celular en cuestión (Götz y Huttner, 2005) (Figura 2).



**Figura 2: Origen de los distintos linajes neurales en la neurogénesis y en la gliogénesis.** Esquema de la generación de los distintos linajes neurales mostrando la relación existente entre las células neuroepiteliales (NE), las células de la glía radial (GR), los progenitores celulares intermedios (PCI), y las neuronas (N) o neuroglia (nG). Las flechas grises indican el tipo de división celular, y la naranja indica un proceso de transformación directa (modificado de Götz y Huttner, 2005).

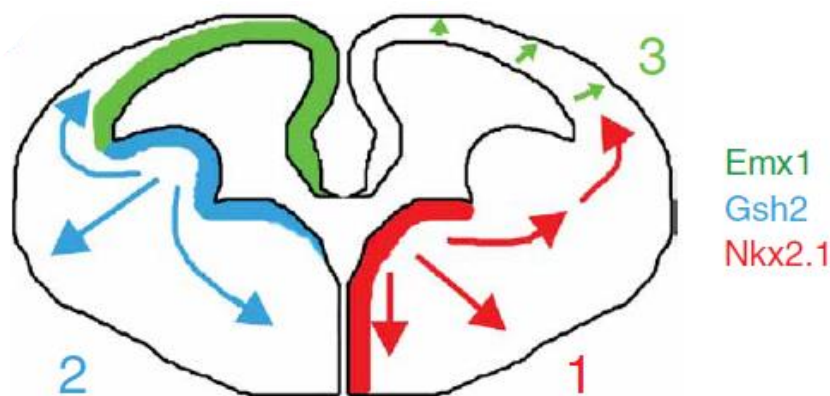
### *Las células de la glía NG2*

Las células de la glía NG2 o glía NG2 (inicialmente denominadas ploidendrocitos o sinantocitos) son un tipo glial poco estudiado y el más enigmático del cerebro (revisado en Butt, 2005; Richardson y cols., 2011). Presentan una morfología estrellada y un cuerpo celular pequeño con varios procesos radiales (Polito y Reynolds, 2005). Se definieron hace tres décadas por su expresión del antígeno neural/glial 2 (NG2), un proteoglicano condroitín sulfato, y fueron referidas como células precursoras de oligodendrocitos (OPCs, Levine, 1989). Sin embargo, la mayoría permanece en el SNC adulto diferenciándose en mayor número en la sustancia blanca que en la sustancia gris (Psachoulia y cols., 2009; Simon y cols., 2011; Young y cols., 2013). Actualmente se las clasifica como una nueva clase de células gliales diferente de los astrocitos y de los oligodendrocitos (Butt y cols., 2005; Richardson y cols., 2011). Teniendo esto en consideración, y para distinguirlas de células presentes en el cerebro no gliales que también expresan el antígeno neural/glial 2 (NG2) – como son los pericitos o algunos

macrófagos, transitoriamente tras una lesión – muchos autores se refieren a ellas como glía NG2 (Nishiyama y cols., 2005; Trotter y cols., 2010; Richardson y cols., 2011; García-Marqués y cols., 2014).

Aunque poseen propiedades y características parecidas a las de las células madre, las células de la glía NG2 – se distinguen de estas por la expresión de NG2 y del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) (Nishiyama y cols., 2009). En el SNC maduro, se caracterizan por su amplia y homogénea distribución a lo largo de la sustancia blanca y gris de todas las regiones del SNC, y por ser la población celular con la tasa de proliferación más alta, excluyendo las regiones neurogénicas (zona subventricular e hipocampo) (Dawson y cols., 2003). A medida que las células de la glía NG2 se diferencian a oligodendrocitos maduros, van perdiendo la expresión tanto de NG2 como de PDGFR $\alpha$ , y comienzan a expresar marcadores típicos de oligodendrocitos: el antígeno O4, galactocerebrósido, y la proteína básica de mielina (MBP) (Nishiyama y cols., 2009). A diferencia de los astrocitos, la glía NG2 no expresa la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) ni el transportador glial de glutamato-aspartato (GLAST). La glía NG2 también difiere de la microglía, y no expresan los antígenos microgliales F4/80 y CD11b, ni la lectina de unión GSA-IB<sub>4</sub> en el SNC o ante una lesión desmielinizante (Dawson y cols., 2000; Nishiyama y cols., 2009).

En el cerebro en desarrollo de roedores, las dos primeras oleadas de generación de las células de la glía NG2 se dan durante el periodo embrionario de E12 a E18, en la zona ventral germinal de las eminencias ganglionares medial (EGM) y lateral (EGL), definidos por los factores de transcripción Nkx2.1 y Gsh2, respectivamente. Más tarde, de E18 a P7, hay una oleada de generación a nivel dorsal, definida por Emx1 (Figura 3) (Kessaris y cols., 2006; Tong y cols., 2015; Winkler y cols., 2018). Una vez migran desde de las zonas germinales, estas células comienzan a adquirir características propias del linaje glial NG2 como la expresión del proteoglicano NG2, a presentar uno o más procesos y a proliferar y migrar hasta colonizar todo el parénquima. En el cerebro anterior, las células de la glía NG2 de la neocorteza provienen en su mayoría de dominios dorsales. Sin embargo, la población de células NG2 del cuerpo calloso es heterogénea en su origen, ya que derivan de dominios dorsales y ventrales (Hill y Nishiyama, 2014). Postnatalmente, aunque la población del linaje glial NG2 de la región dorsal del cerebro anterior es mantenida por la proliferación de las propias células de la glía NG2, hay, además – de forma minoritaria - otra génesis de células de la glía NG2 desde las células progenitoras que residen en la zona subventricular en los ventrículos laterales (Menn y cols., 2006).



**Figura 3: Esquema de las tres oleadas de generación consecutivas de células de la glía NG2 a partir de precursores de diferentes regiones de la zona ventricular telencefálica.** La primera oleada de generación se da en E12.5 y viene definida por *Nkx2.1* (1); la segunda se da a partir de progenitores que expresan *Gsh2* y comienza en E15.5 (2); y la tercera ocurre alrededor del estadio embrionario E18 y viene definida por *Emx1* (3) (Kessaris y cols., 2006).

### *Heterogeneidad en las células de la glía NG2*

Aunque el número de células de la glía NG2 que hay entre animales jóvenes y animales adultos permanece estable, es la población más proliferativa en el cerebro adulto fuera de los nichos neurogénicos (Dawson y cols., 2003), ya que todas las células de la glía NG2 son capaces de entrar en división celular (Young y cols., 2013). Sin embargo, la tasa de proliferación de estas células – muy elevada en estadios posnatales – disminuye con la edad, pues presentan en el adulto un ciclo celular más prolongado en el tiempo, debido a una fase G1 más larga (Psachoulia y cols., 2009; Simon y cols., 2011; Young y cols., 2013; Dimou y Götz, 2014) y que el número de células dividiéndose disminuye con la edad (Dawson y cols., 2003). El análisis clonal de estas células puso de manifiesto el aumento del número de células por clon en cerebro adulto (García-Marqués y cols., 2014). Una de las funciones de estas células de la glía NG2 es la de diferenciarse a oligodendrocitos maduros (Nishiyama, 2009; Psachoulia y cols., 2009; Dimou y Simons, 2017), lo que explicaría que no existan diferencias en el número de células de la glía NG2 entre animales jóvenes y adultos. La génesis de nuevos oligodendrocitos continúa en el cerebro adulto y la tasa de diferenciación es muy elevada (Zhu y cols., 2011; Young y cols., 2013).

La capacidad de proliferación y diferenciación de la glía NG2 es diferente según el área cortical, lo que indica una heterogeneidad entre los grupos de células de la glía NG2 de la sustancia blanca y la sustancia gris. En la sustancia blanca presentan una tasa de proliferación basal más elevada, y una mayor diferenciación a oligodendrocitos que las células de la glía NG2 que residen en la sustancia gris (Psachoulia y cols., 2009; Simon y cols., 2011; Viganò y cols., 2013; Young y cols., 2013). Estas diferencias se deben en parte a factores externos, es decir, que la sustancia blanca promueve la diferenciación a



oligodendrocitos, y también a propiedades intrínsecas de las células. De hecho, se ha visto que las células de la sustancia blanca presentan una respuesta de proliferación mayor que las de la sustancia gris ante el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), una molécula secretada por neuronas y astrocitos (Hill y cols., 2013).

Asimismo, estas células reaccionan ante lesiones cerebrales y en enfermedades desmielinizantes: aumentan su tasa de proliferación, se vuelven hipertróficas, y migran hacia el lugar de la lesión, produciéndose una acumulación de estas células en el área lesionada poco después del daño. Y es en estadios más tardíos reaccionan los astrocitos cercanos a la lesión, que se hipertrofian y proliferan (Simon y cols., 2011). En el caso de las enfermedades desmielinizantes las células de la glía NG2 pueden diferenciarse a oligodendrocitos mielinizantes y tratar de reparar el daño (Komitova y cols., 2011; Dimou y cols., 2015; Viganò y cols., 2016).

Además, las células de la glía NG2 son capaces de diferenciarse a astrocitos protoplásmicos de la sustancia gris, sobre todo de zonas posteriores ventrales (corteza entorrinal, hipotálamo y tálamo) (Dimou y Gallo, 2015). Esta diferenciación comienza en estadios embrionarios tardíos, y termina durante la primera semana postnatal (antes del pico de generación de oligodendrocitos) y está caracterizada por una disminución en la expresión de Olig2 (Kessaris y cols., 2006; Trotter y cols., 2009; Van Tilborg y cols., 2017). Las células de la glía NG2 son capaces de generar oligodendrocitos o astrocitos, pero no ambos. Es decir, no parecen ser células bipotenciales (Zhu y cols., 2011). Como células de la glía NG2 muy próximas entre sí pueden tener destinos celulares muy diferentes (diferenciarse a oligodendrocitos, generar astrocitos, o permanecer como células de la glía NG2), la diferenciación a uno u otro linaje no parece depender de señales extracelulares, lo que lleva a pensar que existe una heterogeneidad intrínseca en las células de la glía NG2 del cerebro embrionario, y que esta puede estar especificada por el momento o la zona de procedencia (Hill y Nishiyama, 2014). En cuanto a su posible función como precursor de neuronas, actualmente hay mucha controversia, y no hay resultados concluyentes (Kondo y Raff, 2000; Trotter y cols., 2010; Richardson y cols., 2011; Zhu y cols., 2011; Nishiyama y cols., 2016).

Por último, es interesante destacar que hay neuronas que establecen contactos sinápticos directos con las células de la glía NG2 de diferentes regiones cerebrales (Bergles y cols., 2000; Gallo y cols., 2008; Bakiri y cols., 2009; Dimou y Gallo 2015; Nakano y cols., 2017). Es por esta característica por la que a este tipo celular se le ha diferenciado como el quinto tipo de linaje glial, y por el que también se les llama “sinantocitos” (Butt y cols., 2005). Lo novedoso de estas conexiones es que se tratan de transmisiones sinápticas cuánticas, propias de la comunicación neuronal, mientras que el resto de células de la glía solo detectan moléculas que se han acumulado en el espacio extracelular. Este tipo de conexión permite una mayor resolución temporal y espacial en la transmisión de la información (Gallo y cols., 2008). Las terminales que reciben las células de la glía NG2 pueden ser glutamatérgicas o GABAérgicas (Káradóttir y cols., 2008). En la sustancia blanca del cuerpo calloso son los axones desmielinizados los que establecen contactos sinápticos con las células de la glía NG2 (Bakiri y cols., 2009). Con

lo cual, una de las funciones que podrían tener estas conexiones sinápticas es la de regular la proliferación y la diferenciación a oligodendrocitos mielinizantes, de manera que haya un control de la mielinización de los axones dependiente de la actividad neuronal a lo largo del desarrollo (Bakiri y cols., 2009; Psachoulia y cols., 2009; Sakry y cols., 2011; Hamilton y cols., 2017) y ante lesiones desmielinizantes (Gautier y cols., 2015).

### *Rastreo de linajes celulares*

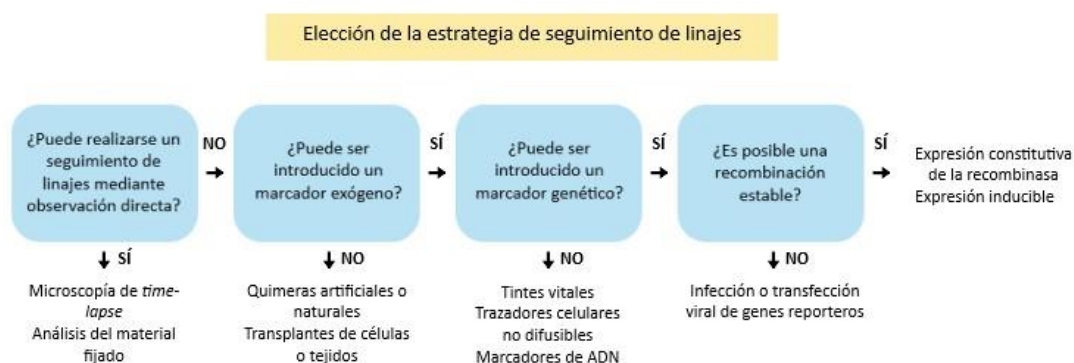
Una forma de conocer el origen, el destino, y el comportamiento celular es hacer un seguimiento de los linajes celulares, de forma que permita identificar y seguir a la progenie de un único progenitor neural. La determinación de los linajes y el estudio de las relaciones clonales entre las células, ayuda a comprender el desarrollo, la homeostasis y las enfermedades que afectan a los diferentes tejidos.

Una manera de rastrear los diferentes linajes es marcar una única célula progenitora, de forma que el marcaje se transmita a toda su progenie. El resultado es que todas las células que procedan de un mismo progenitor tengan el mismo marcaje; a este grupo de células se le denominará: clon. Para que un marcador sea válido, es importante no cambiar las propiedades de las células marcadas, ni de la progenie, ni la de las células vecinas. La “etiqueta” debe transmitirse a todas las células hijas, mantenerse en el tiempo, y no marcar a células no pertenecientes al clon (Kretzschmar y Watt, 2012).

El análisis clonal, por lo tanto, es una herramienta para responder a la pregunta – tan candente hoy en día – de si la heterogeneidad presente en el cerebro adulto está determinada ya durante el desarrollo embrionario. Además, es particularmente importante en el estudio de la biología de células madre, ya que hay una gran heterogeneidad dentro del conjunto de progenitores.

A finales del siglo XIX Whitman inicia los primeros estudios de rastreo de linajes celulares en embriones de sanguijuelas (Whitman, 1887) continuando después con descripciones de linajes en otros invertebrados, incluyendo nematodos, erizos de mar y ascidias. Inspirado por el hecho de que las células surgieran de otras células preexistentes y no por generación espontánea (revisado en: Kretzschmar y Watt, 2012), descubrieron que ya en estadios tempranos había células únicas con destinos y funciones diferentes en el desarrollo. A partir de entonces, se comenzaron a realizar estudios acerca de las relaciones entre linajes en embriones de invertebrados, como es el caso de *C. elegans* nematodo del cual, mediante microscopía de *time-lapse* también por observación directa, se determinó el destino de todas sus células embrionarias (Sulston y cols., 1983). Las ventajas de trazado de linajes por observación directa incluyen la velocidad y facilidad del uso de la técnica, y que no es invasiva. Sin embargo, una limitación de esta técnica es la necesidad de un embrión transparente con un número pequeño de células, limitando el estudio de embriones mamíferos a los cultivos, lo que altera

potencialmente el comportamiento. Por lo que a lo largo del siglo XX se fueron desarrollaron distintas técnicas para el seguimiento de los linajes celulares (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema para la elección de la estrategia del trazado de linajes (modificado de Kretzschmar y Watt, 2012).

A principios del siglo XX se comenzaron a usar trazadores radiactivos y tintes no tóxicos. Sin embargo, tras el descubrimiento de la proteína verde fluorescente (GFP) (Ward y Bokman, 1982; Chalfie y cols., 1994) y la  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* (codificada por el gen LacZ) (Mismer y Rubin, 1987; Son y cols., 1996), se empezaron a usar sobre todo marcadores genéticos para el seguimiento de linajes celulares, ya que a diferencia de los anteriores no se propagan a células vecinas, se expresan de manera estable y la marca es heredada por toda la progenie, lo que hace que sea una técnica muy apropiada para estudios de seguimiento de linajes. Los marcadores genéticos pueden ser introducidos directamente por inyección, transfección, o infección viral (revisado en Kretzschmar y Watt, 2012).

Un método muy eficiente para introducir un gen reportero en las células, es la infección retroviral (Luskin y cols., 1988), que permitió mostrar que las células de la glía radial son un progenitor común para las células de la glía y las neuronas (Noctor y cols., 2001). Esto permite establecer relaciones de parentesco entre las células cuando se reduce la cantidad de virus en cada inyección, marcando a una sola célula progenitora. Además, los retrovirus usados son defectuosos para la replicación, de manera que no dan lugar a una segunda infección. El virus, tras el proceso infectivo, desencadena la integración de una copia de la secuencia para un gen reportero en el genoma de la célula huésped, que será transmitida a toda su progenie (Petit y cols., 2005). Posteriormente, y para desarrollar análisis clonales más extensos y más fiables, se desarrollaron librerías de retrovirus en los que cada virus era portador de un gen reportero y de una secuencia específica amplificable por PCR (Golden y cols., 1995). Esto proporcionó una mejora en la resolución clonal mediante la secuenciación de la marca amplificable. Sin embargo, este método solo permite marcar células en división y, además, los vectores retrovirales pueden silenciarse espontáneamente.

También se han usado lentivirus – capaces de infectar tanto a células quiescentes como en división – para estudios de análisis clonal (Hansen y cols., 2010; Weber y cols., 2011).

Otra aproximación experimental utilizada para mapear el destino celular es el trasplante de células y tejidos desde un embrión a otro hospedador, aunque es difícil conseguir una resolución de célula única. En los estudios iniciales, Spemann y Mangold (1924), distinguían el tejido del hospedador del donante basándose en el color (revisado en Kretschmar y Watt, 2012). Otra estrategia consistió en marcar las células del injerto con timidina tritiada y luego trasplantarlas a un huésped sin marcaje (Rosenquist, 1981). Hay numerosas opciones para distinguir donante y hospedador, sin embargo, esta técnica es bastante invasiva lo que puede ocasionar un cambio en las propiedades de las células estudiadas, y el hecho de estar en un tejido huésped puede dar lugar a cambios de destino celular de las células injertadas, lo que llevaría a conclusiones erróneas.

Muchas de estas técnicas incluyen el uso de marcadores fluorescentes para seguir a la descendencia de la célula marcada. Las ventajas del uso de un reportero fluorescente frente a otro no fluorescente son principalmente su facilidad de aplicación en estudios *in vivo*, y la capacidad de observación del tejido sin necesidad de procesamiento.

El abordaje que ha desplazado a los otros es el de la recombinación genética. Por él, una enzima recombinasa se expresa de manera específica en un tejido o célula activando la expresión de un gen reportero, que constituirá la marca genética heredable por la progenie. Uno de los sistemas de recombinación más usados – sobre todo en ratón – ha sido el de Cre-LoxP, en el cual la Cre recombinasa cataliza la recombinación entre las secuencias de reconocimiento *loxP* (Sauer, 1987). Esta recombinasa se expresa en una primera línea de ratón transgénico bajo un promotor específico de tejido/célula. Esta línea se cruza con otro ratón transgénico portador de un gen reportero precedido por una secuencia *loxP-STOP-loxP*, que impide la expresión del gen reportero en esta segunda línea de ratones. En los animales de la progenie que expresen ambos constructos, Cre activará la expresión del gen reportero en cuestión mediante la escisión de la secuencia *STOP* (revisado en Kretschmar y Watt, 2012). La primera proteína reportera fluorescente que se expresó con esta técnica en ratones fue la GFP (Mao y cols., 2001). Este método tiene la ventaja de que permite controlar no solo la expresión de Cre espacial y temporalmente, sino también el momento de comienzo de su actividad. Una forma es uniendo Cre al receptor humano de estrógenos (ER). En ausencia de ligandos, como el tamoxifeno, la proteína de fusión Cre recombinasa-ER (CreER) es mantenida en el citoplasma. Sin embargo, la aplicación de tamoxifeno activa la translocación de CreER al núcleo donde Cre puede recombinar los sitios *loxP*. Para evitar la activación de CreER por un ligando endógeno generaron mutantes de CreER. El más efectivo es el constructo CreER<sup>T2</sup> (lo obtuvieron mutando el ER humano) (Feil y cols., 1997).

Aprovechando estos avances metodológicos, en primer lugar se han determinado linajes celulares en líneas transgénicas-Cre inducibles por tamoxifeno que expresaban proteínas fluorescentes bajo promotores de tipos celulares específicos (Magavi y cols., 2012). En segundo lugar, aprovechando la gran variedad de reporteros fluorescentes existentes, se han hecho estudios de análisis de linajes celulares, basándose en la expresión de diferentes combinaciones de estos reporteros, como si de un código de

colores diferenciador de células hermanas se tratara. Uno es el análisis de mosaicos con dobles marcadores (MADM), basado en la recombinación homóloga intra-cromosomal (en células mitóticas y postmitóticas), mediada por Cre recombinasa, de secuencias incompletas de GFP y de la proteína fluorescente roja (RFP), que resulta en la reconstrucción de estas secuencias. El resultado es un mosaico de células verdes, rojas o amarillas (Zong y cols., 2005). Este sistema se desarrolló en ratones, y más tarde Griffin y colaboradores lo adaptaron para *Drosophila melanogaster* (Griffin y cols., 2009). Sin embargo, el método *Brainbow* – desarrollado en el cerebro de ratones – fue el que causó mayor impacto en el desarrollo de técnicas de análisis clonal (Livet y cols., 2007). Este usa la recombinación aleatoria Cre/*lox* para generar una variedad de combinaciones de tres o más proteínas fluorescentes (XFPs) en cada célula. La diferencia de color permite distinguir y seguir múltiples células, independientemente de la cercanía entre estas. La recombinación de tres copias transgénicas puede generar hasta diez combinaciones de colores diferentes (Livet y cols., 2007) (Figura 5). Esta técnica es muy útil para distinguir neuronas adyacentes y para visualizar interacciones celulares. Sin embargo, ha sido *Confetti* – una nueva versión de este método – la que se empezó a usar para el estudio de linajes en ratones (Snippert y cols., 2010). *Brainbow* también fue adaptado para estudios de mapeo de destino en *D. melanogaster* dando origen a *d-Brainbow* (Hampel y cols., 2011) y a *Flybow* (Hadjieconomou y cols., 2011), y en el pez cebra (Pan y cols., 2011). Otra modificación de este método es la de marcaje RGB, que usa el marcaje con lentivirus para inducir la expresión aleatoria de tres XFPs (Weber y cols., 2011).

**a** XFP combinations

Outcome for each copy			Resulting colour
1	2	3	
C	C	C	Blue
C	C	Y	Light blue
C	Y	Y	Blue-green
Y	Y	Y	Green
Y	Y	R	Light green
Y	R	R	Orange
R	R	R	Red
R	R	C	Magenta
R	C	C	Purple
R	C	Y	Grey

**Figura 5: *Brainbow*.** El esquema muestra el sistema *Brainbow* y cómo la combinación independiente de tres copias transgénicas tiene el potencial de generar diez combinaciones de colores diferentes (Livet y cols., 2007).

Hay, además, nuevas aproximaciones – como la co-electroporación de constructos de ADN codificantes de XFPs en las células de interés – que permiten seguir a toda la progenie de células únicas sin necesidad de usar organismos modificados genéticamente. En este sentido en el laboratorio de la Dra. López-Mascaraque se desarrolló un método de análisis clonal retrospectivo estocástico, denominado *StarTrack*, que permitió rastrear la progenie de células individuales (García-Marqués y López-Mascaraque, 2013). El método *StarTrack* es una nueva herramienta de análisis clonal *in vivo*, basada en la generación de marcas específicas rastreables y heredadas

por todas las células que componen un linaje. Esta aproximación se basa en la electroporación con vectores de transposones PiggyBac que codifican para seis proteínas fluorescentes distintas, expresadas en núcleo y citoplasma bajo la regulación de promotores específicos (García-Marqués y López-Mascaraque, 2013; Figueres-Oñate y cols., 2016). Las electroporaciones en el ventrículo lateral de embriones de ratón permiten introducir de forma estocástica, la mezcla de plásmidos en los progenitores, donde se generará una marca específica y heredable por toda la progenie.

Para obtener una marca estable y heredable para toda la progenie celular, los constructos de XFPs que diseñaron incluían regiones integrables flanqueadas por dos secuencias de repeticiones terminales (TRs) que eran reconocidas por la transposasa piggyBac, y co-electroporaron dos constructos adicionales; uno codificante para la versión hiperactiva de la transposasa del sistema PiggyBac (hyPBasa); y el otro de la Cre recombinasa unida al receptor de estrógenos mutado inducible por tamoxifeno (CreER<sup>T2</sup>). Para lograr una expresión eficiente en todos los tipos neurales, la expresión de la hyPBasa y de Cre estaba regulada por un promotor ubicuo. Incorporando la estrategia Cre-LoxP inducible por tamoxifeno se logró la inhibición de los plásmidos no integrados por la transposasa del sistema piggyBac, consiguiendo así un código de color inalterable para todas las células derivadas de un mismo progenitor (Figueres-Oñate y cols., 2015).

Inicialmente, el método StarTrack se desarrolló utilizando el promotor humano de GFAP (hGFAP) con el fin de estudiar las células astrogiales clonalmente relacionadas (García-Marqués y López-Mascaraque, 2013). El análisis de la dispersión clonal de astrocitos en el córtex puso de manifiesto la relación que hay entre linaje y heterogeneidad en los astrocitos demostrando que la heterogeneidad astrocitaria ya está especificada durante el desarrollo del SNC (García-Marqués y López-Mascaraque, 2013; García-Marqués y cols., 2014, 2017; Parmigiani y cols., 2015; Cerrato y cols., 2018). Además, gracias a estos avances descubrieron que hay una alta heterogeneidad en la respuesta astrocitaria en lesiones, y que esta no se debe tan solo a factores externos, sino también a componentes intrínsecos relacionados con el linaje celular y determinados en etapas embrionarias del desarrollo (Martín-López y cols., 2013; Bribián y cols., 2018).

Usando el promotor hGFAP hicieron también un análisis clonal de una subpoblación de células de la glía NG2 que tenían activo ese promotor. En él vieron que los progenitores de estas células comienzan a diferenciarse en E14, que migran siguiendo el curso de la glía radial, y que los clones de estas células comienzan a crecer de forma masiva formando los clones más numerosos derivados del neuroepitelio – llegando a formar clones de hasta 400 células – cuando casi todos los procesos del desarrollo han concluido, a partir del cuarto mes (García-Marqués y cols., 2014).

Con el propósito de ampliar el estudio a toda la progenie de un único progenitor – independientemente del linaje – se desarrolló el UbC-*StarTrack*, una modificación de *StarTrack* que usa un promotor ubicuo (Figueres-Oñate y cols., 2015, 2016), que permite trazar todos los linajes neurales a partir de una célula única.

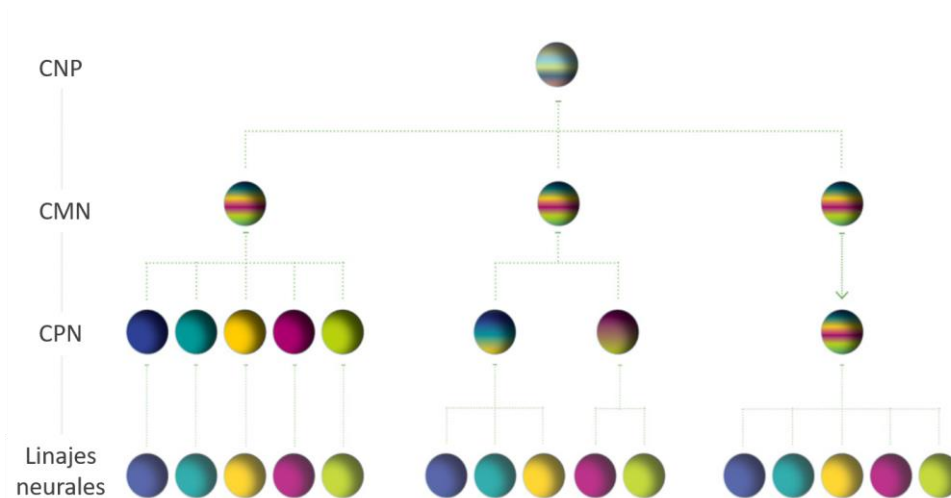
Como ya se ha visto previamente, las células del linaje glial NG2 tienen múltiples funciones – precursores de astrocitos (Kessaris y cols., 2006; Trotter y cols., 2009; Dimou y Gallo, 2015) y de oligodendrocitos (Nishiyama y cols., 2009; Psachoulia y cols., 2009; Komitova y cols., 2011; Simon y cols., 2011; Viganò y cols., 2013; Young y cols., 2013; Dimou y cols., 2015; Dimou y Simons, 2017), establecimiento de conexiones sinápticas directas en distintas regiones cerebrales, y su respuesta activa ante lesiones cerebrales (Komitova y cols., 2011; Simon y cols., 2011; Dimou y cols., 2015) – y no parecen constituir una población homogénea (Zhu y cols., 2011; Hill y Nishiyama, 2014). Este tipo celular es el único que se divide, fuera de los nichos neurogénicos, en un cerebro adulto sano y ante una lesión. Son las células que más proliferan, por encima de los astrocitos (Dawson y cols., 2003; Psachoulia y cols., 2009; Simon y cols., 2011; Young y cols., 2013; Dimou y Götz, 2014; García-Marqués y cols., 2014). Por eso, este tipo celular, ante estudios de nuevas dianas terapéuticas para lesiones cerebrales y enfermedades neurodegenerativas y desmielinizantes, tiene tanta importancia. Hay estudios que indican que estas células representan una diana efectiva y viable para regenerar no solo oligodendrocitos, sino también neuronas por reprogramación (Heinrich y cols., 2014; Dimou y Gallo, 2015). Sin embargo, y a pesar de la gran trascendencia que puede llegar a tener este linaje celular, quedan por descifrar algunas incógnitas que rodean a las células de la glía NG2. Por ello, se hacen necesarios estudios que proporcionen un mayor conocimiento en la clasificación funcional y anatómica de estas células, así como el origen de las diferencias entre las posibles subpoblaciones.

Aquí presentamos una nueva adaptación del método StarTrack, NG2-StarTrack, que permite realizar un análisis clonal y un seguimiento específico de los linajes celulares que expresen NG2 a partir de progenitores únicos. El uso del NG2-StarTrack nos permitirá seguir de manera más específica y completa el linaje glial NG2 que ayudará a avanzar en la descripción del desarrollo de estas células. En primer lugar, de la capacidad de proliferación de estas células en el adulto. Después, realizar una descripción acerca de la heterogeneidad de estas células – provenientes todas de la misma región dorsal del neuroepitelio – según la región en la que se encuentren. A su vez, este método nos permitirá evaluar el patrón de dispersión de las células de la glía NG2 en función de sus relaciones de parentesco. Y, por último, determinar el origen de la heterogeneidad de estas células. Es decir, si las diferencias existentes entre los grupos de clones de células de la glía NG2 ya están determinadas durante el desarrollo temprano, o si por el contrario, se adquieren de forma tardía.

## Hipótesis y objetivos

En el presente este trabajo se plantea como hipótesis de partida que la heterogeneidad de las células de la glía NG2 viene ya determinada desde el desarrollo, más concretamente desde los progenitores neurales presentes en la zona dorsal del ventrículo en el estadio embrionario 14 (E14). Estudios previos realizados por el grupo de la Dra. López-Mascaraque, usando la herramienta de análisis clonal StarTrack, clasificaron los astrocitos según su origen ontogénico (García-Marqués y López-Mascaraque, 2013), demostrando que los progenitores neurales en estadios embrionarios tempranos están ya comprometidos a dar lugar a astrocitos de un tipo específico (protoplásmicos, fibrosos, piales o astrocitos que rodean vasos sanguíneos).

Por ello, en el presente trabajo nuestra hipótesis de partida es que los progenitores que van a dar lugar a la glía NG2, podrían estar limitados a dar únicamente este tipo celular, o bien pueden ser bipotenciales (comprometidos a dar lugar a dos tipos celulares), o multipotenciales (Figura 6). También se plantea la posibilidad de que haya progenitores neurales comprometidos previamente a dar lugar a células de la glía NG2 destinada a estar localizada en zonas concretas del cerebro adulto, como la sustancia gris o blanca, dadas las diferentes características que presenta la glía NG2 ubicada en estas zonas (ver introducción).



**Figura 6: Diferenciación a linajes y compromiso de los progenitores.** Durante el desarrollo los progenitores se van diferenciando a estados cada vez más comprometidos. Las células neuroepiteliales pluripotentes (CNP) proliferan y se van diferenciando células madre neurales (CMN). Después, son las células progenitoras neurales (CPN) las que dan lugar a las células de los distintos linajes neurales. Los progenitores neurales pueden estar comprometidos a un determinado linaje, ser bipotenciales, o ser multipotenciales. Pueden coexistir progenitores neurales con potenciales diferentes (Figueres-Oñate, 2016).

Para confirmar nuestra hipótesis, se plantea como objetivo principal, realizar un análisis clonal del linaje de la glía NG2 derivada de progenitores únicos del palio dorsal en el



estadio E14. Para ello, se desarrolló la herramienta de análisis clonal, NG2-StarTrack, y se usó para los siguientes objetivos específicos:

- a) Dispersión rostro-caudal de las células clonalmente relacionadas que expresen los plásmidos NG2-StarTrack y análisis de las posibles diferencias a dos edades adultas (3 y 12 meses de edad)
- b) Análisis cuantitativo de los clones a dos edades adultas (3 y 12 meses de edad)
- c) Análisis cualitativo de la heterogeneidad de los clones

## Materiales y métodos

### Animales

Los ratones de la cepa C57BL/6 se obtuvieron del estabulario Instituto Cajal (CSIC), donde se mantienen en condiciones controladas de humedad y temperatura, con ciclos de luz y oscuridad y alimentación *ad libitum*. Todos los procedimientos se sometieron a evaluación del Comité de Bioética del CSIC, y se llevaron a cabo en conformidad con las normas éticas sobre el uso y el bienestar de los animales experimentales de la Unión Europea (2010/63 / UE) y del Ministerio de Agricultura de España (RD 1201/2005 y L 32/2007).

El período de gestación de los ratones es de 19 días, considerando el día de la visualización del tapón vaginal como día embrionario (E) 0 y el día de nacimiento como el día postnatal (P) 0. Los ratones de P90 en adelante se consideraron adultos.

### Electroporación Intra Utero (IUE)

Las hembras preñadas se anestesiaron con 4% de isoflurano y se mantuvieron con anestesia inhalatoria 2-3% de isoflurano. Inicialmente se introdujo a las ratonas gestantes en una cámara de inducción dónde se les aplicó 2,5% de isoflurano en un flujo de oxígeno de 0,8 L/m. Una vez inducidas, se mantuvo la anestesia a 1,6%, a lo largo de la cirugía, mediante una máscara apropiada para ratón y una placa térmica a 37 ° C. Antes de la cirugía, a los ratones se les administró un antibiótico (enrofloxacin, 5 mg / kg) y un analgésico antiinflamatorio AINE (meloxicam, 300 µg / kg) por vía subcutánea. Los cuernos uterinos se expusieron mediante laparotomía y por transiluminación con luz fría se localizaron los ventrículos del cerebro del embrión. Se inyectó intraventricularmente la mezcla de plásmidos con el colorante Fast Green, para facilitar su visualización, utilizando micropipetas de vidrio mediante un sistema de microinyección hidráulico. Para la electroporación se emplazaron dos electrodos a cada lado de la cabeza y con el polo positivo en el lado del ventrículo por el que se había inyectado la solución, aplicando uno o dos trenes de 5 pulsos cuadrados de 50 ms de longitud con 950 ms entre cada pulso. Los voltajes aplicados fueron de 35 V. Una vez electroporados todos los embriones, los cuernos uterinos se colocaron nuevamente en la cavidad abdominal y la incisión abdominal se suturó con sutura de ácido poliglicólico absorbible, mientras que la incisión de la piel con sutura de seda. Después de limpiar la herida con solución salina y cubrir el área con povidona yodada, el animal se colocó en una manta térmica. Se permitió que los embriones se desarrollaran hasta la edad seleccionada para su análisis.

### Procesamiento del tejido

Los ratones fueron analizados en estadios adultos a P90 y P360. Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal, 40-50 mg / kg). Los cerebros se fijaron mediante perfusión transcárdica con PFA al 4% y luego se fijaron durante la noche en el mismo fijador. Para la sección, los cerebros se incluyeron en agarosa al 4% y se seccionaron en serie con un vibrátomo (Leica, vibrátomo) con una orientación coronal (50µm de grosor). Para el almacenamiento a largo plazo, las secciones se montaron en portaobjetos de vidrio y se cubrieron con el medio de montaje Mowiol, para posteriormente almacenarlos a 4°C.

### *Caracterización inmunohistoquímica*

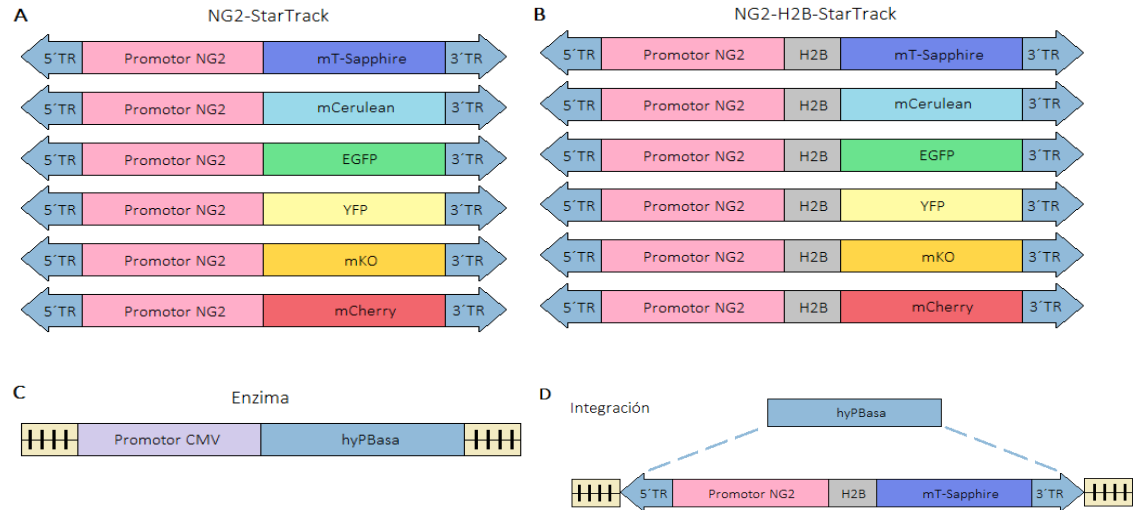
Las células marcadas con mediante la electroporación se identificó por sus características morfológicas y luego se confirmaron mediante la expresión de diferentes marcadores inmunohistoquímicos. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: ratón anti-NeuN (1: 500, Chemicon MAB377) para clasificar las células neuronales; anti-PDGFRα de conejo (1: 300, SantaCruz-338), anti-S100β de ratón (1: 300), anti-Olig2 de conejo (1: 3000, Millipore), anti-MBP de rata (1: 1000, Abcam R7349) para identificar linajes gliales. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos secundarios conjugados apropiados marcados con el fluoróforo rojo lejano (1: 1000, Alexa Fluor 633 o 647, Molecular Probes). Finalmente, las secciones se montaron en portaobjetos en PB / glicerol (1: 1) para una evaluación preliminar en el microscopio de fluorescencia y las secciones seleccionadas se cubrieron definitivamente con Mowiol y se almacenaron a 4°C.

### *Vectores de ADN*

El análisis clonal se hizo usando una modificación del método StarTrack (Figura 7) (García-Marqués y López-Mascaraque, 2013), que denominaremos NG2-StarTrack. Brevemente, StarTrack se basa en la integración genómica de 12 plásmidos, que codifican seis proteínas reporteras fluorescentes diferentes con localización citoplasmática o nuclear, bajo un promotor específico. En el método original, el promotor que regulaba la expresión de los reporteros fluorescentes era hGFAP. Con el que se demostró que StarTrack es un método clonal eficiente en el seguimiento de los clones astrogiales *in vivo* a partir de progenitores únicos, mediante la generación de códigos de colores específicos para cada clon (García-Marqués y López-Mascaraque, 2013; García-Marqués y cols., 2014). Posteriormente, el método se modificó para trazar la progenie de todos los tipos celulares mediante la incorporación de un promotor ubicuo, el Ubc-StarTrack (Figueroa-Oñate y cols., 2016).

En este estudio, se ha usado una nueva variante con el promotor de NG2 murino dando lugar al plásmido de expresión citoplasmática pPB-NG2-XFP (plásmidos NG2-StarTrack; Figura 7). La secuencia que codifica la histona h2B (H2B) se amplificó por PCR utilizando los plásmidos StarTrack pPB-NG2-XFP como plantilla y se fusionaron con cada proteína fluorescente en los plásmidos NG2-StarTrack: la pista NG2-H2B StarTrack. La integración genómica de este plásmido fue mediada por co-electroporación con un vector que contiene una transposasa hiperactiva del sistema PiggyBac (HypBase; amablemente proporcionada por el Prof. Bradley; Yusa y cols., 2011). Esto dio como resultado un

código único de combinación de colores y localización, que identifica clones celulares derivados de progenitores individuales. Esto, permitirá seguir la dispersión celular de la progenie a partir de células progenitoras de ratones embrionarios y generar una marca heredable en los linajes celulares NG2.



**Figura 7: Método NG2-StarTrack.** (A) Esquema de los seis plásmidos con las diferentes proteínas fluorescentes expresadas en el citoplasma: NG2-StarTrack. (B) Esquema de los seis plásmidos codificantes para las diferentes proteínas de fusión H2B-fluorescentes: NG2-H2B-StarTrack. (C) La transposasa PiggyBac hiperactiva (hyPBasa) guiada por un promotor de expresión ubicua se añadió a la mezcla de electroporación NG2-StarTrack. (D) La transposasa (hyPBasa) inserta, tras la electroporación, varias copias de los plásmidos en el genoma de la célula (modificado de Figueres-Oñate y cols., 2016).

### Adquisición de imágenes

La expresión de los diferentes plásmidos se comprobó en un microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse E600) con los filtros apropiados (Semrock): UV-2A (FF01-334 / 40-25) Cerulean (FF01-405 / 10), GFP (FF01-473 / 10), YFP (FF01-520 / 15), mKO (FF01-540 / 15), mCherry (FF01-590 / 20) y Cy5 (FF02-628 / 40-25). Posteriormente, se tomaron imágenes en un microscopio confocal (Leica, TCS-SP5), capturando los diferentes XFP en canales separados. La longitud de onda de excitación (Ex) y emisión (Em) para cada XFP fue (en nanómetros, nm): mTSapphire (Ex: 405; Em: 520-535), mCerulean (Ex: 458; Em: 468-480), EGFP (Ex: 488; Em: 498-510), YFP (Ex: 514; Em: 525-535), mKO (Ex: 514; Em: 560-580), mCherry (Ex: 561; Em: 601-620) y Alexa 633 (Ex: 633; Em: 650-760). Las líneas de láser se encontraban entre el 25 y el 40% en todos los casos. Las proyecciones máximas de cada imagen se realizaron utilizando el software confocal (LASAF Leica) y NIH-ImageJ.

### Análisis de datos

Para las diferentes cuantificaciones utilizamos el siguiente software: Excel 2013 (Microsoft Office) y LAS-X (Leica).

Para analizar las células relacionadas clonalmente después de la electroporación NG2-StarTrack se usó una macro personalizada integrada en el software ImageJ (NIH) diseñada en colaboración con el departamento de análisis de imagen del Instituto Cajal. El paso crítico en el análisis de la macro es el de seleccionar apropiadamente las células con marcaje. Se ajustó un umbral para cada imagen en cada canal para crear una selección de células positivas para cada XFP. La sustracción de fondo se realizó antes de la selección del umbral aplicando un filtro suave para optimizar la elección de la señal celular. Luego, se creó una imagen binaria, que incluía todas las células con marcaje positivo en alguno de los canales, generándose así todas las selecciones positivas. Para analizar cada célula como un punto individual, se realizó un análisis sobre la imagen binaria separando células contiguas que hubieran quedado marcadas como una sola. Una vez que realizada la selección, se determinó una intensidad de fluorescencia mínima para considerar todos los valores como un marcador fluorescente positivo. Esta intensidad mínima fue la misma para cada animal analizado. Posteriormente, los datos se organizaron automáticamente en una tabla que incluía el valor máximo y mínimo de intensidad de XFP para cada célula marcada y su expresión fluorescente específica para cada uno de los seis reporteros. Por último, y en función de los datos obtenidos, se asignó un código de color para cada una de las células etiquetadas, tras esto, se ordenaron según sus códigos para evaluar el estudio de posibles células relacionadas clonalmente.

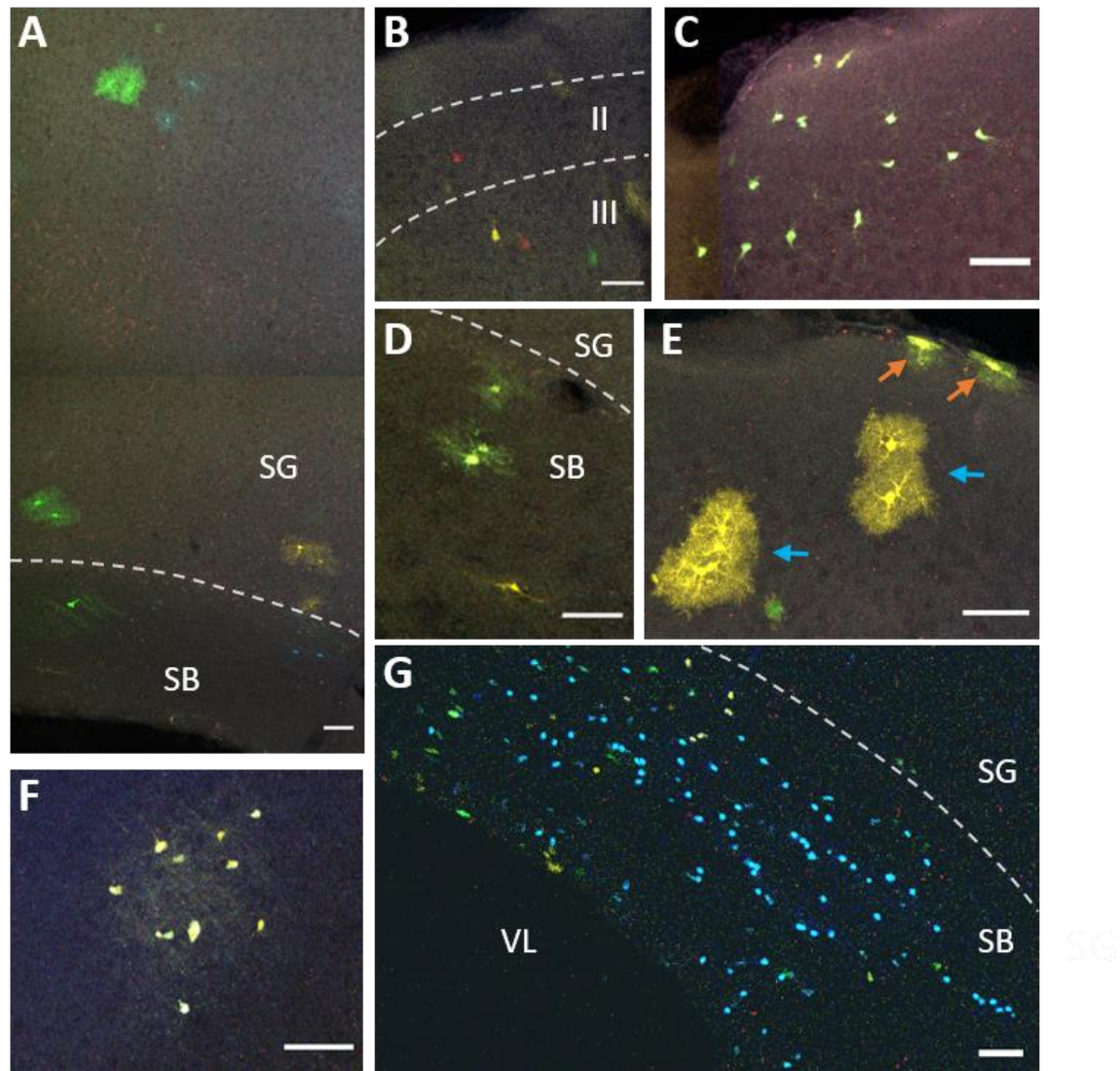
Se realizaron análisis adicionales para determinar las células hermanas no solo en función de la combinación de XFP expresados, sino también según los rangos de la intensidad de fluorescencia y de la ubicación del fluoróforo (núcleo o citoplasma).

## Resultados

### *Caracterización de los linajes identificados con NG2-StarTrack*

En este estudio hemos analizado la progenie de progenitores únicos del ventrículo lateral de la región palial en E14, cuando está a punto de terminar la neurogénesis y comienza la diferenciación a células de la glía NG2 (Figura 1) (Kessaris y cols., 2006; Richardson y cols., 2006; Young y cols., 2007; Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009; Martynoga y cols., 2012; Ortega y cols., 2013; García-Marqués y cols., 2014). Tras la electroporación *intra utero* del ventrículo lateral, se produce de forma aleatoria una marca celular específica de los progenitores dorso-laterales que rodean el ventrículo lateral. Es a partir de estos progenitores paliales de dónde deriva la subpoblación telencefálica de las células de la glía NG2 (García-Marqués y cols., 2014). La marca celular específica es heredada por toda la progenie, sin embargo, únicamente aparecerán marcadas aquellas células hijas que tengan activo el promotor NG2.

En primer lugar, se analizó de forma cualitativa la corteza de cerebros de ratones (electroporados a E14 con la mezcla NG2-StarTrack), a diferentes tiempos: P90, lo que se consideraría un adulto joven (Figura 8 A-F), y P360, que correspondería a un ratón adulto (Figura 8G). En ambas edades, aparecían marcadas no solo las células del linaje glial NG2, sino también astrocitos, oligodendrocitos e incluso alguna célula del linaje neuronal en capas II-III de la corteza cerebral (Figura 8B).



**Figura 8:** (A-F) Análisis clonal en un cerebro de ratón P90 electroporado a E14 con la mezcla NG2-StarTrack. (B-F) Células de los distintos linajes que expresan NG2-StarTrack en cortes coronales (B) Neuronas en las capas corticales II y III. (C) Células NG2 en corteza. (D) Astrocitos fibrosos presentes en la sustancia blanca (SB). (E) Astrocitos protoplásmicos (flechas azules) y astrocitos piales (flechas naranjas) en la corteza cerebral. (F) Oligodendrocitos en corteza cerebral. (G) Detalle de un corte coronal de cerebro de ratón P360 electroporado a E14 con NG2-StarTrack, mostrando un gran clon de oligodendrocitos (células azules) en sustancia blanca, cerca del ventrículo lateral (VL). La identificación de los tipos celulares se comprobó mediante inmunohistoquímica. (A-G) Las barras de escalas corresponden a 50 μm.

### *Análisis clonal de los linajes que expresan NG2*

La electroporación *intra utero* de la mezcla de plásmidos nuclear y citoplasmática del NG2-StarTrack permitió el seguimiento del linaje glial. Una composición de fluoróforos con la misma localización celular e intensidad es lo que define a un clon de células hermanas (Figura 9). Las células fueron identificadas como neuronas, astrocitos,

oligodendrocitos y células de la glía NG2 siguiendo criterios morfológicos e inmunohistoquímicos.

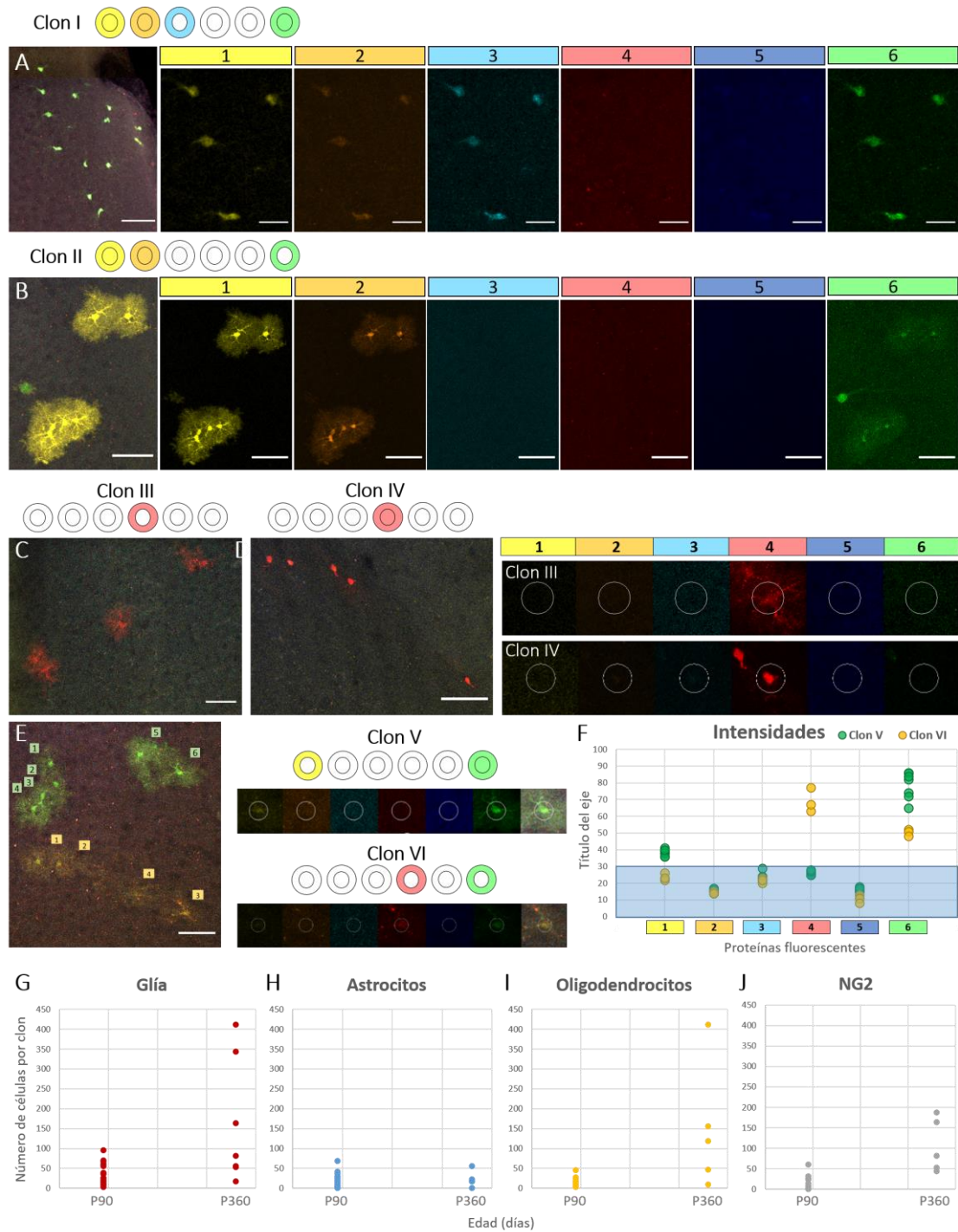
Para identificar a las células hermanas, en primer lugar, se realizó un análisis clonal cualitativo basado en la combinación y localización (nuclear y/o citoplasmática) de los 6 fluoróforos. De esta manera se identificaron diferentes clones a lo largo de la corteza y del cuerpo calloso (Figura 8). Para determinar la identidad clonal se hizo un análisis para identificar las células que compartían la misma marca fluorescente tanto en el citoplasma como en el núcleo (Figura 9). Además, para una mayor certeza, se cuantificó la intensidad de expresión de cada fluoróforo (Figura 9 F). Las distintas intensidades de los XFP detectadas en cada célula individual son importantes a la hora de definir un clon, ya que la cantidad de plásmidos del mismo fluoróforo insertado en un progenitor a E14 puede variar. Estudios previos del laboratorio mostraron que la variación de intensidad máxima que define a un clon es de 150 puntos (Figueres-Oñate y cols., 2016). Estos parámetros son necesarios para definir de forma precisa qué células pertenecen a un determinado clon.

Hay casos en que la combinación de fluoróforos entre células es la misma, sin embargo, esto no siempre significa que procedan del mismo progenitor ya que la localización de la expresión (núcleo o citoplasma) puede ser distinta (Figura 9 C, D). Además, para determinar la identidad clonal también se establecieron los valores de intensidad de cada uno de los fluoróforos.

NG2-StarTrack permitió la identificación de varios clones sobre todo de linajes gliales ya que la electroporación se hizo en E14, en las últimas etapas de la neurogénesis. El análisis clonal mostró que el número de células por clon en edades más tempranas (P90) oscila entre 3 y 90 ( $N = 31$ ), y entre 17 y 412 ( $N = 10$ ) a edades más tardías (P360) (siendo  $N$  el número de clones analizados para cada caso) (Figura 9, gráfica G).

Un estudio más detallado de los distintos linajes pertenecientes a diferentes clones reveló que, a P90, el número de células de cada linaje glial perteneciente a un clon era parecido, siendo la media de 18 astrocitos ( $N = 27$ ) (Figura 9, gráfica H), 20 oligodendrocitos ( $N = 10$ ) (Figura 9, gráfica I) y 21 células NG2 ( $N = 6$ ) (Figura 9, gráfica J), siendo  $N$  el número de clones analizados para cada caso. Sin embargo, a P360, mientras que el número de astrocitos por clon permanece constante a lo largo del tiempo, tanto los clones de oligodendrocitos como los de las células de la glía NG2 aumentan con la edad. Siendo la media del número de células por clon de 23 ( $N = 5$ ) en el caso de los astrocitos (Figura 9, gráfica H), 149 ( $N = 5$ ) en el de los oligodendrocitos (siendo  $N$  el número de clones analizados para cada caso) (Figura 9, gráfica I), y 106 ( $N = 5$ ) en el caso de las células de la glía NG2 (Figura 9, gráfica J).





**Figura 9: Células clonalmente relacionadas de distintos linajes en cortes coronales del cerebro de ratón adulto joven (P90, tras electroporación *intra utero* de NG2-StarTrack a E14).** (A-E) Las distintas combinaciones de colores que definen a las células pertenecientes a un clon, están detalladas por la expresión de cada reportero fluorescente ordenados de la siguiente manera: YFP, mKO, mCerulean, mCherry, mT-Sapphire y EGFP. (A) Análisis celular cualitativo de las células NG2, basado tanto en la combinación de colores como en la localización celular (nuclear o citoplasmática). Estas células poseen la combinación correspondiente al *clon I*. (B) Análisis celular cualitativo de los astrocitos protoplásmicos, con una combinación diferente, correspondiente al *clon II*. (C-D) Análisis celular cualitativo de astrocitos protoplásmicos (C) y fibrosos (D) pertenecientes a los clones III y IV, respectivamente. (E) Análisis de dos grupos

distintos de clones de Astrocitos, próximos entre sí. Los valores de la intensidad para cada marcador fluorescente están gráficamente representados para las células individuales de los dos clones (etiquetas verdes y amarillas). El *clon V* está formado por 6 células (verde), y el *clon VI* por 4 (amarillo). (G-J) Gráficas mostrando el número de células de la glía totales (G), de astrocitos (H), de oligodendrocitos (I) y de células de la glía NG2 en cada clon a P90 y a P360. Las barras de escalas corresponden a 50  $\mu\text{m}$ .

### *Distribución cortical del linaje oligodendroglial en sustancia blanca y sustancia gris*

NG2-StarTrack también ha permitido estudiar a las células del linaje oligodendroglial (Figura 8 F y G). Las relaciones clonales fueron establecidas en función de la combinación de la expresión y localización de los fluoróforos, y en función de las intensidades de estos. Se vieron grupos de células hermanas tanto en sustancia blanca como en sustancia gris, en el cerebro de ratones adultos jóvenes (P90) y en el de adultos (P360). A P360 se observaron grupos muy numerosos de oligodendrocitos hermanos en el cuerpo calloso, y grupos más reducidos a lo largo de la corteza. En adultos jóvenes (P90), a diferencia del adulto (P360), el número de oligodendrocitos en el cuerpo calloso era mucho menor. A pesar de todo, seguía siendo mayor que el de los grupos de oligodendrocitos localizados en la sustancia gris (corteza cerebral) (Figura 10, gráficas A y B; gráficas C y D). Los grupos de células de la glía NG2 hermanas, sin embargo, solo fueron localizadas en la sustancia gris. Estos grupos de células también tienden a hacerse más numerosos con la edad, aumentando a su vez el área que abarcan en el cerebro (Figura 10, gráficas A y B; gráficas C y D).

### *Dispersión clonal de las células de distintos linajes en el eje rostro-caudal*

El análisis cualitativo de las células de los distintos linajes celulares ha puesto de manifiesto la existencia de “clones mixtos” tanto a P90 como a P360. Llamamos clones mixtos a aquellos clones compuestos por células de más de un linaje celular.

Esto parece indicar que existen progenitores neurales en el desarrollo que son capaces de dar lugar a diferentes tipos celulares.

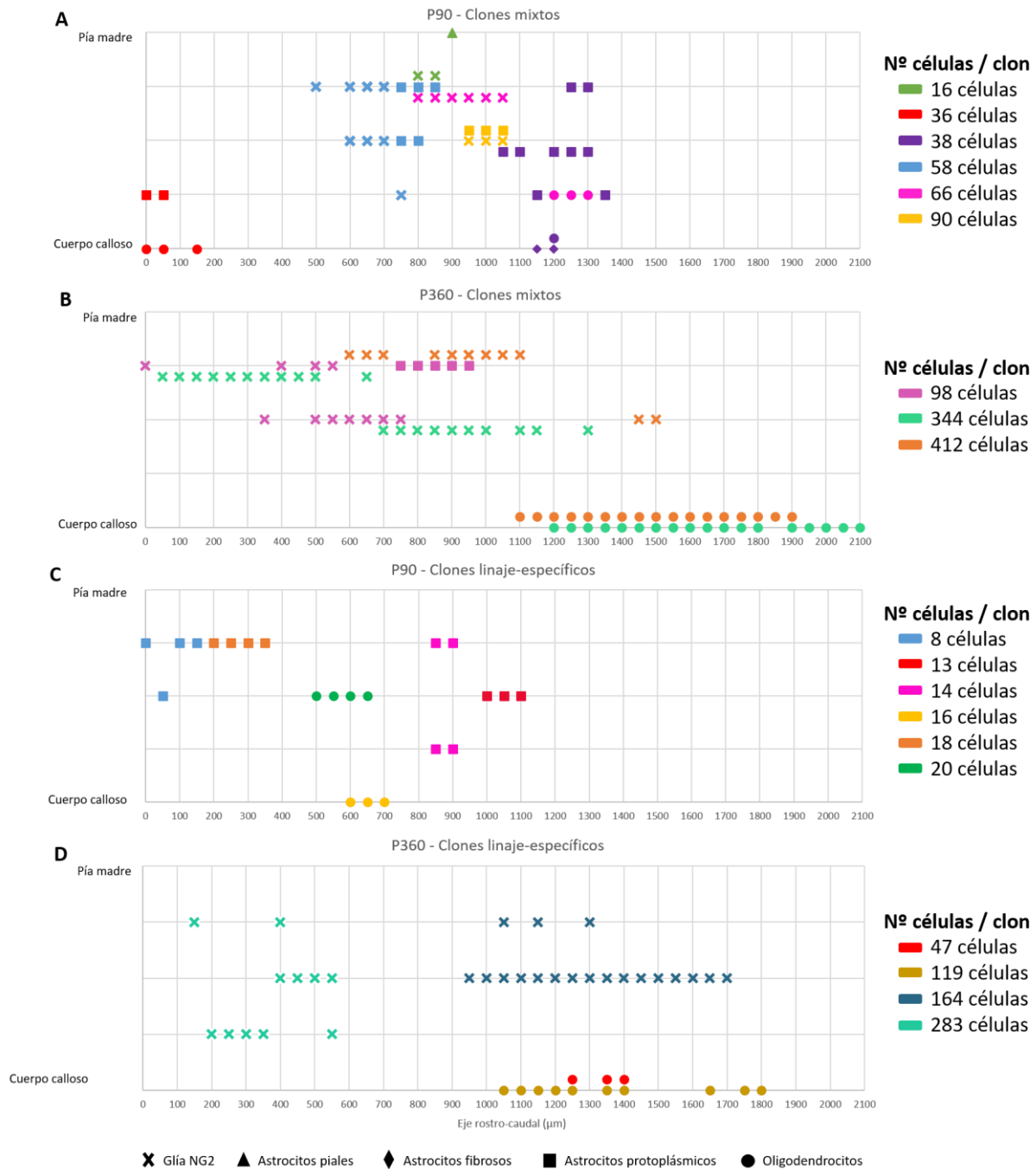
Las distintas poblaciones de células que conforman los clones mixtos a P90 aparecen agrupadas siempre abarcando como mucho, una distribución rostro-caudal de 350  $\mu\text{m}$  (Figura 10, gráfica A). No obstante, en a P360 esta distribución aumenta llegando a distribuirse a lo largo de 2050  $\mu\text{m}$  (Figura 10, gráfica B).

La distribución rostro-caudal de los linajes varía con la edad. En primer lugar, cabe destacar las diferencias tan patentes del linaje glial NG2, cuya distribución rostro caudal es más extensa con la edad (Figura 10, gráficas A y B). Además, no se encontró ningún grupo de células de la glía NG2 formando clones específicos del linaje glial NG2 en cerebros de ratón adulto joven (P90), mientras que en adulto (P360) están muy

extendidos por la corteza formando clones específicos de su linaje y clones mixtos (Figura 10, gráficas *C* y *D*). Esta población celular – compuesta por todas las células de la glía NG2 que componen los clones mixtos y los clones específicos del linaje glial NG2 – se agrupan principalmente en los dos tercios superiores de la corteza, sin que su distribución se modifique con la edad. Además, hay clones mixtos de células de la glía NG2 con astrocitos piales (Figura 9 *A* y *B*; Clon I), con astrocitos protoplásmicos y con oligodendrocitos. A P90 los más abundantes eran los clones mixtos formados por células de la glía NG2 y astrocitos protoplásmicos. Sin embargo, a P360 no se encontró ningún clon mixto formado por estos dos tipos celulares (Figura 10, *A -B*).

El seguimiento con NG2-StarTrack de la dispersión clonal de oligodendrocitos, muestra que su número aumenta notablemente con la edad, tanto en clones mixtos y como en clones específicos del linaje oligodendroglial. Estos, a lo largo del desarrollo del cerebro adulto, se distribuyen en su mayoría por el cuerpo calloso, concentrándose sobre todo en las regiones más caudales (en comparación con el resto de linajes gliales) (Figura 10, gráficas *A* y *B*; gráficas *C* y *D*). A P90, los oligodendrocitos de la sustancia blanca aparecen formando clones mixtos tanto con astrocitos protoplásmicos, como con astrocitos fibrosos, como con células de la glía NG2. Sin embargo, los de la sustancia gris solo han mostrado tener relaciones de parentesco con las células de la glía NG2 (Figura 10, gráfica *A*). A P360 se ha visto que los oligodendrocitos forman clones mixtos solo con el linaje glial NG2 (Figura 10, gráfica *B*).

Como ya se comentó anteriormente, tras el seguimiento clonal de las células astrogliales se observó que estas células establece, relaciones de parentesco, formando clones mixtos, tanto con las células de la glía NG2, como con oligodendrocitos. Casi todos los astrocitos con marcaje eran astrocitos protoplásmicos, sin diferencias entre el cerebro de ratón adulto joven (P90) y el de adulto (P360). No obstante, se observa una clara disminución en el número de astrocitos entre estas dos edades respectivamente (Figura 9 *H*). Esto ocurre porque el tamaño de electroporación del animal P360 fue menor que las realizadas en los animales P90.



**Figura 10: Gráficas de distribución rostro-caudal y dorso-ventral de distintos clones mixtos y de clones de linaje específicos.** Los colores señalan un grupo clonal en cada capa. **(A-B)** Las gráficas contienen los datos de dispersión de los clones gliales mixtos del cerebro de ratón **(A)** adulto joven (P90), y **(B)** adulto (P360). **(C-D)** Las gráficas contienen los datos de dispersión de los clones específicos para cada linaje glial (linaje-especificos) del cerebro de ratón **(C)** P90, y **(D)** P360.

## Discusión

Nuestros resultados refuerzan la importancia de las células de la glía NG2 en el cerebro. Su dispersión progresiva por todo el cerebro a medida que este se va desarrollando, y el hecho de que estén clonalmente emparentadas con muchos linajes celulares, hace muy peculiar a esta población.

En primer lugar, nuestros resultados apuntan al NG2-StarTrack como un método eficiente para el análisis clonal de las células de la glía NG2, mostrando la existencia de células neurales de todos los linajes – gliales y neural – que expresan NG2 a partir de los progenitores que rodean el ventrículo lateral. Este hecho podría tener dos posibles explicaciones. La primera, que aquellas células marcadas – es decir, que expresen NG2 – procedan de una diferenciación temprana en el desarrollo de las células de la glía NG2, dada su potencialidad de diferenciarse a oligodendrocitos (OPC; Levine, 1989; Nishiyama y cols., 2009; Psachoulia y cols., 2009; Simon y cols., 2011; Young y cols., 2013) y a astrocitos, aunque se limitan a los protoplásmicos (Kessaris y cols., 2006; Trotter y cols., 2009; Zhu y cols., 2011; Dimou y Gallo, 2015). Asimismo, distintos estudios afirman que también son capaces de generar neuronas (Kondo y Raff, 2000; Trotter y cols., 2010; Richardson y cols., 2011; Zhu y cols., 2011; Nishiyama y cols., 2016). Con lo cual, cabe la posibilidad de que las células, no pertenecientes al linaje glial NG2, que vemos marcadas con el NG2-StarTrack procedan de las células de la glía NG2. La segunda explicación es que las células progenitoras expresen el NG2 y que, al diferenciarse, su progenie – o parte de ella al menos – no apague el promotor NG2.

Nuestros resultados y los previos del laboratorio, demuestran la alta tasa de proliferación en el cerebro adulto de las células de la glía NG2 (García-Marqués y cols., 2014), mientras que los clones de astrocitos son los clones gliales más reducidos en cuanto a número en el adulto joven (Figueres-Oñate y cols., 2016).

En cuanto a los clones de oligodendrocitos, se ha visto que el número de células por clon aumenta con la edad, llegando a formar clones de mayor tamaño que los de las células de la glía NG2 en el cerebro en un estadio avanzado de la edad adulta (P360). Estudios previos – respaldando este resultado – afirman que en el cerebro adulto se mantiene una nueva generación de oligodendrocitos mediante la diferenciación de las células NG2 (Zhu y cols., 2011; Young y cols., 2013). Nuestros resultados apuntan al hecho de que la población oligodendroglial por clon aumenta con la edad, lo que quiere decir que hay diferenciación a oligodendrocitos en el adulto. Además, se ha observado que este incremento en el número de células de oligodendrocitos por clon ocurre únicamente en la sustancia blanca, dónde la tasa de diferenciación de las células de la glía NG2 a oligodendrocitos es mayor (Psachoulia y cols., 2009; Simon y cols., 2011; Young y cols., 2013), lo que hace más probable que el incremento en el número de oligodendrocitos en los clones se deba a la diferenciación del linaje glial NG2.

Por último, hemos mostrado la existencia de clones mixtos con el método NG2-StarTrack como ya se habían demostrado usando UbC-StarTrack (Figueres-Oñate y cols., 2016).

Nuestros resultados muestran la existencia de cierta bipotencialidad entre los progenitores neurales a E14, que les permite diferenciarse a varios tipos celulares. Esta potencialidad de los progenitores no es incompatible con el hecho de que la diferenciación de las células de la glía NG2 (OPCs) en la sustancia blanca sean las causantes de clones mixtos entre grupos de oligodendrocitos y estas. De hecho, en edad adulta juvenil (P90) el cerebro no muestra aun clones mixtos entre oligodendrocitos de la sustancia blanca y las células NG2. Mientras que a una edad más avanzada (P360) hemos encontrado dos clones mixtos de oligodendrocitos en sustancia blanca y de células de la glía NG2 en sustancia gris, muy llamativos por su gran dispersión rostro-caudal (un clon de 2050  $\mu\text{m}$  y otro de 1300  $\mu\text{m}$ ) y por el elevado número de células que los componen (344 células: 188 células de la glía NG2 y 156 oligodendrocitos, y 412 células: 28 células de la glía NG2 y 384 oligodendrocitos, respectivamente). El hecho de que haya tantos oligodendrocitos, y teniendo en cuenta que son las células NG2 las que proliferan en el cerebro adulto (Dawson y cols., 2003), puede estar indicando que los oligodendrocitos provengan de la diferenciación de las células de la glía NG2.

La existencia tanto de clones mixtos como de clones linaje-específicos nos lleva a confirmar que en estadios tempranos del desarrollo embrionario (E14) existen tanto progenitores bipotenciales, como progenitores comprometidos ya a linajes determinados. Esto significaría, que la heterogeneidad de las células de la glía – y en concreto de las células de la glía NG2 – está en cierta medida determinada en los progenitores neurales.

Además, la existencia de tanta variedad entre los clones mixtos que contienen a células del linaje glial NG2 indican que esta población es muy heterogénea.

En resumen, este trabajo supone un paso hacia delante en el intento de comprender cómo el desarrollo influye en la diversidad neural. Se hacen necesarios, estudios futuros en los que se amplíen las edades tanto de electroporación como de análisis. Esto podría aportar nuevos datos sobre la existencia de poblaciones de células de la glía NG2, de distintas procedencias ontogénicas, contribuyendo a su heterogeneidad en cerebro adulto y explicando su diversidad funcional.

## Bibliografía

- Bakiri, Y., Attwell, D., & Káradóttir, R. (2009). Electrical signalling properties of oligodendrocyte precursor cells. *Neuron glia biology*, 5(1-2), 3-11.
- Bergles, D. E., Roberts, J. D. B., Somogyi, P., & Jahr, C. E. (2000). Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature*, 405(6783), 187.
- Bribián, A., Pérez-Cerdá, F., Matute, C., & López-Mascaraque, L. (2018). Clonal Glial Response in a multiple sclerosis mouse model. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12.
- Butt, A. M., Hamilton, N., Hubbard, P., Pugh, M., & Ibrahim, M. (2005). Synantocytes: the fifth element. *Journal of anatomy*, 207(6), 695-706.
- Cerrato, V., Parmigiani, E., Figueres-Oñate, M., Betizeau, M., Aprato, J., Nanavaty, I., ... & Buffo, A. (2018). Multiple origins and modularity in the spatiotemporal emergence of cerebellar astrocyte heterogeneity. *PLoS biology*, 16(9), e2005513.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
- Chanas-Sacre, G., Rogister, B., Moonen, G., & Leprince, P. (2000). Radial glia phenotype: origin, regulation, and transdifferentiation. *Journal of neuroscience research*, 61(4), 357-363.
- Clarke, L. E., Young, K. M., Hamilton, N. B., Li, H., Richardson, W. D., & Attwell, D. (2012). Properties and fate of oligodendrocyte progenitor cells in the corpus callosum, motor cortex, and piriform cortex of the mouse. *Journal of Neuroscience*, 32(24), 8173-8185.
- Dawson, M. R., Levine, J. M., & Reynolds, R. (2000). NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors?. *Journal of neuroscience research*, 61(5), 471-479.
- Dawson, M. R., Polito, A., Levine, J. M., & Reynolds, R. (2003). NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(2), 476-488.
- Del Río-Hortega, P. (1919). El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia en estado nor-mal. II. Intervencion de la microglia en los procesos patológicos. III. Naturaleza probable de la microglia. *Boll. Societed Esp. Biol.*, 9, 69-120.
- Dimou, L., & Gallo, V. (2015). NG 2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia*, 63(8), 1429-1451.
- Dimou, L., Simon, C., Kirchhoff, F., Takebayashi, H., & Götz, M. (2008). Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 28(41), 10434-10442.
- Dimou, L., & Götz, M. (2014). Glial cells as progenitors and stem cells: new roles in the healthy and diseased brain. *Physiological reviews*, 94(3), 709-737.
- Dimou, L., & Simons, M. (2017). Diversity of oligodendrocytes and their progenitors. *Current opinion in neurobiology*, 47, 73-79.

- Edwards, M. A., Yamamoto, M., & Caviness Jr, V. S. (1990). Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. *Neuroscience*, 36(1), 121-144.
- Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and biophysical research communications*, 237(3), 752-757.
- Figueres-Oñate, M., Gutiérrez, Y., & López-Mascaraque, L. (2014). Unraveling Cajal's view of the olfactory system. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 55.
- Figueres-Oñate, M., García-Marqués, J., Pedraza, M., De Carlos, J. A., & López-Mascaraque, L. (2015). Spatiotemporal analyses of neural lineages after embryonic and postnatal progenitor targeting combining different reporters. *Frontiers in neuroscience*, 9, 87.
- Figueres-Oñate, M., García-Marqués, J., & López-Mascaraque, L. (2016). UbC-StarTrack, a clonal method to target the entire progeny of individual progenitors. *Scientific reports*, 6, 33896.
- Figueres-Oñate, M. (2016). Clonal analysis of neural progenitors (Doctorado). Universidad Autónoma de Madrid.
- Gallo, V., Mangin, J. M., Kukley, M., & Dietrich, D. (2008). Synapses on NG2-expressing progenitors in the brain: multiple functions?. *The Journal of physiology*, 586(16), 3767-3781.
- Ganat, Y. M., Silbereis, J., Cave, C., Ngu, H., Anderson, G. M., Ohkubo, Y., ... & Vaccarino, F. M. (2006). Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo. *Journal of Neuroscience*, 26(33), 8609-8621.
- García-Marqués, J., & López-Mascaraque, L. (2013). Clonal identity determines astrocyte cortical heterogeneity. *Cerebral cortex*, 23(6), 1463-1472.
- García-Marqués, J., Núñez-Llaves, R., & López-Mascaraque, L. (2014). NG2-glia from pallial progenitors produce the largest clonal clusters of the brain: time frame of clonal generation in cortex and olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 34(6), 2305-2313.
- Gautier, H. O., Evans, K. A., Volbracht, K., James, R., Sitnikov, S., Lundgaard, I., ... & Káradóttir, R. T. (2015). Neuronal activity regulates remyelination via glutamate signalling to oligodendrocyte progenitors. *Nature communications*, 6, 8518.
- Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, a020537.
- Golden, J. A., Fields-Berry, S. C., & Cepko, C. L. (1995). Construction and characterization of a highly complex retroviral library for lineage analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5704-5708.
- Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). Developmental cell biology: The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(10), 777.
- Griffin, R., Sustar, A., Bonvin, M., Binari, R., del Valle Rodriguez, A., Hohl, A. M., ... & Bakal, C. (2009). The twin spot generator for differential Drosophila lineage analysis. *Nature methods*, 6(8), 600.



- Hadjieconomou, D., Rotkopf, S., Alexandre, C., Bell, D. M., Dickson, B. J., & Salecker, I. (2011). Flybow: genetic multicolor cell labeling for neural circuit analysis in *Drosophila melanogaster*. *Nature methods*, 8(3), 260.
- Hamilton, N. B., Clarke, L. E., Arancibia-Carcamo, I. L., Kougoumtzidou, E., Matthey, M., Káradóttir, R., ... & Attwell, D. (2017). Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *Glia*, 65(2), 309-321.
- Hampel, S., Chung, P., McKellar, C. E., Hall, D., Looger, L. L., & Simpson, J. H. (2011). Drosophila Brainbow: a recombinase-based fluorescence labeling technique to subdivide neural expression patterns. *Nature methods*, 8(3), 253.
- Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R., & Kriegstein, A. R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*, 464(7288), 554.
- Hill, R. A., Patel, K. D., Medved, J., Reiss, A. M., & Nishiyama, A. (2013). NG2 cells in white matter but not gray matter proliferate in response to PDGF. *Journal of Neuroscience*, 33(36), 14558-14566.
- Hill, R. A., & Nishiyama, A. (2014). NG2 cells (polydendrocytes): listeners to the neural network with diverse properties. *Glia*, 62(8), 1195-1210.
- Káradóttir, R., Hamilton, N. B., Bakiri, Y., & Attwell, D. (2008). Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter. *Nature neuroscience*, 11(4), 450.
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., & Richardson, W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature neuroscience*, 9(2), 173.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91(2), 461-553.
- Komitova, M., Serwanski, D. R., Richard Lu, Q., & Nishiyama, A. (2011). NG2 cells are not a major source of reactive astrocytes after neocortical stab wound injury. *Glia*, 59(5), 800-809.
- Kondo, T., & Raff, M. (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science*, 289(5485), 1754-1757.
- Kretzschmar, K., & Watt, F. M. (2012). Lineage tracing. *Cell*, 148(1-2), 33-45.
- Kriegstein, A., & Álvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*, 32, 149-184.
- Levine, J. M. (1989). Neuronal influences on glial progenitor cell development. *Neuron*, 3(1), 103-113.
- Livet, J., Weissman, T. A., Kang, H., Draft, R. W., Lu, J., Bennis, R. A., ... & Lichtman, J. W. (2007). Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 450(7166), 56.
- Luskin, M. B., Pearlman, A. L., & Sanes, J. R. (1988). Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with a recombinant retrovirus. *Neuron*, 1(8), 635-647.
- Magavi, S., Friedmann, D., Banks, G., Stolfi, A., & Lois, C. (2012). Coincident generation of pyramidal neurons and protoplasmic astrocytes in neocortical columns. *Journal of Neuroscience*, 32(14), 4762-4772.

- Mao, X., Fujiwara, Y., Chapdelaine, A., Yang, H., & Orkin, S. H. (2001). Activation of EGFP expression by Cre-mediated excision in a new ROSA26 reporter mouse strain. *Blood*, 97(1), 324-326.
- Martín-López, E., García-Marqués, J., Núñez-Llaves, R., & López-Mascaraque, L. (2013). Clonal astrocytic response to cortical injury. *PLoS One*, 8(9), e74039.
- Martynoga, B., Drechsel, D., & Guillemot, F. (2012). Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(10), a008359.
- Menn, B., García-Verdugo, J. M., Yaschine, C., González-Pérez, O., Rowitch, D., & Álvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *Journal of Neuroscience*, 26(30), 7907-7918.
- Misner, D., & Rubin, G. M. (1987). Analysis of the promoter of the *ninaE* opsin gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 116(4), 565-578.
- Nakano, M., Tamura, Y., Yamato, M., Kume, S., Eguchi, A., Takata, K., ... & Kataoka, Y. (2017). NG2 glial cells regulate neuroimmunological responses to maintain neuronal function and survival. *Scientific reports*, 7, 42041.
- Nishiyama, A., Yang, Z., & Butt, A. (2005). Astrocytes and NG2-glia: what's in a name?. *Journal of anatomy*, 207(6), 687-693.
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., & Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(1), 9.
- Nishiyama, A., Boshans, L., Goncalves, C. M., Wegrzyn, J., & Patel, K. D. (2016). Lineage, fate, and fate potential of NG2-glia. *Brain research*, 1638, 116-128.
- Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S., & Kriegstein, A. R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409(6821), 714.
- Ortega, F., Gascón, S., Masserdotti, G., Deshpande, A., Simon, C., Fischer, J., ... & Berninger, B. (2013). Oligodendrogliogenic and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nature cell biology*, 15(6), 602.
- Pan, Y. A., Livet, J., Sanes, J. R., Lichtman, J. W., & Schier, A. F. (2011). Multicolor Brainbow imaging in zebrafish. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011(1), pdb-prot5546.
- Parmigiani, E., Leto, K., Rolando, C., Figueres-Oñate, M., López-Mascaraque, L., Buffo, A., & Rossi, F. (2015). Heterogeneity and bipotency of astroglial-like cerebellar progenitors along the interneuron and glial lineages. *Journal of Neuroscience*, 35(19), 7388-7402.
- Petit, A. C., Legué, E., & Nicolas, J. F. (2005). Methods in clonal analysis and applications. *Reproduction Nutrition Development*, 45(3), 321-339.
- Polito, A., & Reynolds, R. (2005). NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *Journal of anatomy*, 207(6), 707-716.
- Psachoulia, K., Jamen, F., Young, K. M., & Richardson, W. D. (2009). Cell cycle dynamics of NG2 cells in the postnatal and ageing brain. *Neuron glia biology*, 5(3-4), 57-67.

- Reichenbach, A., & Wolburg, H. (2005). Astrocytes and ependymal glia. *Neuroglia*, 2, 19-35.
- Richardson, W. D., Kessaris, N., & Pringle, N. (2006). Oligodendrocyte wars. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 11.
- Richardson, W. D., Young, K. M., Tripathi, R. B., & McKenzie, I. (2011). NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy?. *Neuron*, 70(4), 661-673.
- Rivers, L. E., Young, K. M., Rizzi, M., Jamen, F., Psachoulia, K., Wade, A., ... & Richardson, W. D. (2008). PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nature neuroscience*, 11(12), 1392.
- Rosenquist, G. C. (1981). Epiblast origin and early migration of neural crest cells in the chick embryo. *Developmental biology*, 87(2), 201-211.
- Sauer, B. (1987). Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 7(6), 2087-2096.
- Sakry, D., Karram, K., & Trotter, J. (2011). Synapses between NG2 glia and neurons. *Journal of Anatomy*, 219(1), 2-7.
- Sierra, A., de Castro, F., del Río-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., & Kettenmann, H. (2016). The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*, 64(11), 1801-1840.
- Simon, C., Götz, M., & Dimou, L. (2011). Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia*, 59(6), 869-881.
- Snippert, H. J., Van Der Flier, L. G., Sato, T., Van Es, J. H., Van Den Born, M., Kroon-Veenboer, C., ... & Clevers, H. (2010). Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*, 143(1), 134-144.
- Son, J. H., Min, N., & Joh, T. H. (1996). Early ontogeny of catecholaminergic cell lineage in brain and peripheral neurons monitored by tyrosine hydroxylase-lacZ transgene. *Molecular brain research*, 36(2), 300-308.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 100(1), 64-119.
- Tong, C. K., Fuentealba, L. C., Shah, J. K., Lindquist, R. A., Ihrie, R. A., Guinto, C. D., ... & Álvarez-Buylla, A. (2015). A dorsal SHH-dependent domain in the V-SVZ produces large numbers of oligodendroglial lineage cells in the postnatal brain. *Stem cell reports*, 5(4), 461-470.
- Trotter, J., Karram, K., & Nishiyama, A. (2010). NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain research reviews*, 63(1-2), 72-82.
- Van Tilborg, E., de Theije, C. G., van Hal, M., Wagenaar, N., de Vries, L. S., Benders, M. J., ... & Nijboer, C. H. (2018). Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. *Glia*, 66(2), 221-238.
- Viganò, F., Möbius, W., Götz, M., & Dimou, L. (2013). Transplantation reveals regional differences in oligodendrocyte differentiation in the adult brain. *Nature neuroscience*, 16(10), 1370.

- Viganò, F., Schneider, S., Cimino, M., Bonfanti, E., Gelosa, P., Sironi, L., ... & Dimou, L. (2016). GPR17 expressing NG2-Glia: Oligodendrocyte progenitors serving as a reserve pool after injury. *Glia*, 64(2), 287-299.
- Wang, D. D., & Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Progress in neurobiology*, 86(4), 342-367.
- Ward, W. W., & Bokman, S. H. (1982). Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry*, 21(19), 4535-4540.
- Weber, K., Thomaschewski, M., Warlich, M., Volz, T., Cornils, K., Niebuhr, B., ... & Dandri, M. (2011). RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nature medicine*, 17(4), 504.
- Whitman, C. O. (1887). A contribution to the history of the germ layers in Clepsine. *Journal of Morphology* 1(1), 105–182.
- Winkler, C. C., Yabut, O. R., Fregoso, S. P., Gomez, H. G., Dwyer, B. E., Pleasure, S. J., & Franco, S. J. (2018). The dorsal wave of neocortical oligodendrogenesis begins embryonically and requires multiple sources of sonic hedgehog. *Journal of Neuroscience*, 38(23), 5237-5250.
- Young, K. M., Fogarty, M., Kessaris, N., & Richardson, W. D. (2007). Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 27(31), 8286-8296.
- Young, K. M., Psachoulia, K., Tripathi, R. B., Dunn, S. J., Cossell, L., Attwell, D., ... & Richardson, W. D. (2013). Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron*, 77(5), 873-885.
- Yusa, K., Zhou, L., Li, M. A., Bradley, A., & Craig, N. L. (2011). A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4), 1531-1536.
- Zawadzka, M., Rivers, L. E., Fancy, S. P., Zhao, C., Tripathi, R., Jamen, F., ... & Rowitch, D. H. (2010). CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell stem cell*, 6(6), 578-590.
- Zhu, X., Hill, R. A., Dietrich, D., Komitova, M., Suzuki, R., & Nishiyama, A. (2011). Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells. *Development*, 138(4), 745-753.
- Zong, H., Espinosa, J. S., Su, H. H., Muzumdar, M. D., & Luo, L. (2005). Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell*, 121(3), 479-492.